



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 DEC. 2001

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30  
www.inpi.fr



4

5

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>27 FEV 2001</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0102624</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>27 FEV. 2001</b> PAR L'INPI <b>Vos références pour ce dossier</b> <i>(facultatif)</i> <b>B 00/4118 FR/GD/LM</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BUREAU D.A. CASALONGA-JOSSE 8, Avenue Percier 75008 PARIS	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date ____ / ____ / ____ N° _____ Date ____ / ____ / ____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____ / ____ / ____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Oxindoles inhibiteurs de CDK-1 et leur application en thérapeutique.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____ / ____ / ____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____ / ____ / ____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____ / ____ / ____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		AVENTIS PHARMA S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			

REMISE DES PIÈCES DATE <b>27 FEV 2001</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI <b>0102624</b>		Réservé à l'INPI		DB 540 W / 190600	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>			B 00/4118 FR/GD/LM		
<b>6 MANDATAIRE</b> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			BUREAU D.A. CASALONGA-JOSSE 8, Avenue Percier 75008 PARIS		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>			Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé			<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance			Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>			Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i> :		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes					
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)			VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI		
A. CASALONGA (bm 92-1044i) Conseil en Propriété Industrielle			C. TRAN		

## Oxindoles inhibiteurs de CDK-1 et leur application en thérapeutique

La présente invention concerne une famille d'oxindoles qui sont des inhibiteurs chimiques du complexe enzymatique Cdc2/cycline B (CDK-1) et leur application en thérapeutique.

Comme cela est bien connu, le cycle cellulaire d'un eucaryote comporte différentes étapes (voir figure 1) :

Après la phase M, qui se compose d'une division nucléaire (mitose) et d'une division cytoplasmique (cytodiérèse), les cellules filles commencent l'interphase d'un nouveau cycle. Cette interphase commence avec la phase G1 pendant laquelle on note une reprise accrue des activités de biosynthèse de la cellule. La phase S commence quand la synthèse de l'ADN démarre et se termine quand les chromosomes se sont répliqués (chaque chromosome est alors composé de deux chromatides sœurs identiques). La cellule entre ensuite en phase G2 (dernière phase de l'interphase) qui se poursuit jusqu'au début de la mitose, initiant la phase M. Au cours de cette phase, les chromatides sœurs se séparent, deux nouveaux noyaux se forment et le cytoplasme se divise pour donner deux cellules filles dotées chacune d'un noyau. La cytodiérèse termine la phase M et marque le début de l'interphase du cycle cellulaire suivant.

La machinerie moléculaire du cycle cellulaire est composée de facteurs de régulation qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire. Le passage d'une phase à l'autre dans un cycle est sous le contrôle d'une famille de protéines sérine/thréonine kinases de petite taille, les kinases dépendantes des cyclines (CDK) qui régulent l'activité de protéines par phosphorylation. Le taux d'expression des CDK est à peu près constant au cours du cycle cellulaire, mais ces protéines kinases sont inactives en elles-mêmes et doivent être activées pour acquérir une activité kinasique. L'activité enzymatique et la spécificité des CDK dépendent de leur association avec une sous-unité régulatrice appartenant à la famille des cyclines.

L'entrée en mitose, en particulier, est sous le contrôle d'un facteur promoteur de la phase M (ou MPF) qui est constitué par l'assemblage d'une molécule de (CDK1=p34<sup>cdc2</sup>) et d'une molécule de cycline B. Le complexe cycline B-CDK1 activé permet la transition G2/M en phosphorylant de nombreux substrats.

Ainsi, la modulation de l'activité du complexe cycline B-CDK1 est un mécanisme clé de l'arrêt de la prolifération cellulaire et les CDK constituent des cibles moléculaires privilégiées dans la recherche d'inhibiteurs sélectifs de la prolifération cellulaire. En effet, certaines propriétés des CDK (en particulier les altérations très fréquentes, dans les tumeurs humaines, des CDK et de leurs régulateurs) et de leurs inhibiteurs protéiques naturels ont encouragé la recherche d'inhibiteurs chimiques de CDK en vue d'applications antitumorales.

De nombreux composés ont ainsi été testés et reconnus comme inhibiteurs de CDK : les purines, les paullones, le flavopiridol, les indirubines, l'olomoucine, la roscovitine, la butyrolactone-1, la toyocamycine et d'autres. Les inhibiteurs chimiques qui agissent plus particulièrement sur le complexe cycline B/CDK1 empêchent en fait la phosphorylation de substrats tels que l'histone H1, les sous-unités  $\gamma$  et  $\delta$  du facteur d'élongation ou la vimentine.

Ainsi, les premiers inhibiteurs chimiques de CDK présentent des propriétés intéressantes qui justifient leur évaluation comme produits anticancéreux potentiels et la poursuite de la recherche de nouvelles molécules plus efficaces.

La demande de brevet WO 96/40116 décrit des oxindoles utilisés dans le but de moduler le signal de transduction de la protéine tyrosine kinase (PTK).

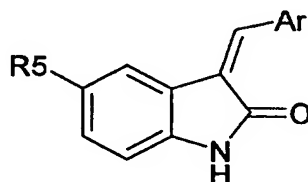
La demanderesse a découvert une famille de composés de la famille des oxindoles ayant une action marquée sur la prolifération cellulaire et sur CDK-1.

L'invention a pour objet des composés nouveaux de la famille des oxindoles.

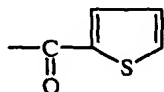
Un autre objet est constitué par leur application comme médicament.

D'autres objets apparaîtront à la lumière de la description et des exemples qui suivent.

La présente invention a ainsi pour objet les composés répondant à la formule (I) :



dans laquelle R5 est choisi parmi les groupements 3-pyridinyle, 5-pyrimidinyle, -CONH-alkyle en C1-C4, -NHCO-alkyle en C1-C4, halogène, -CO<sub>2</sub>R où R peut être hydrogène ou alkyle en C1-C4, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>,



- 5 dans laquelle Ar est choisi parmi les groupements 5-imidazolyle, 2-pyrrolyle éventuellement substitués par un radical alkyle en C1-C4, 2-furyle, ou 2-thiazolyle, sous la forme E, Z ou un mélange des deux formes d'isomères.

Dans les composés de formule (I), R5 désigne préférentiellement un groupement 3-pyridinyle ou -CONH-méthyle ou -NHCO-méthyle et Ar désigne  
10 préférentiellement un groupement 5-imidazolyle ou un 5-(4-méthyl-imidazolyle).

La présente invention a tout particulièrement pour objet les composés de formule (I) telle que définie ci-dessus, répondant aux formules suivantes :

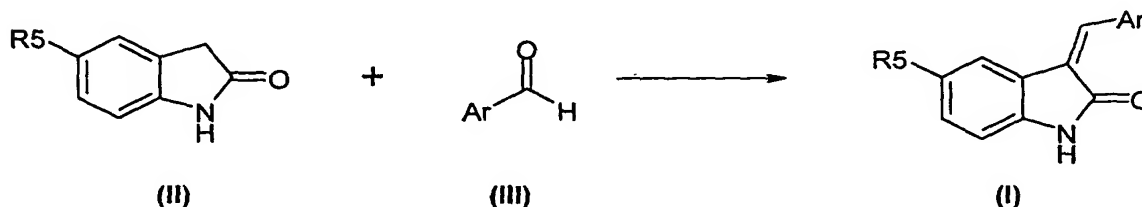
3-(imidazol-4-yl)-5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one,

3-(pyrrol-2-yl)-5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one,

- 15 3-(imidazol-4-yl)-5-N-méthylcarboxamido-indolin-2-one,

3-(imidazol-4-yl)-5-acétylamino-indolin-2-one.

Les composés de formule générale (I), dans lesquels R5 et Ar ont les significations précitées, peuvent être obtenus par couplage d'une indolin-2-one de formule générale (II), dans laquelle R5 a la signification précitée, avec un aldéhyde  
20 aromatique de formule générale (III), dans lequel Ar a la signification précitée, selon le schéma ci-dessous :



25

La réaction de couplage s'effectue généralement dans les conditions décrites par E. Knoevenagel ( Chem. Ber. 1900, 23, 172), à savoir dans un solvant protique comme le méthanol ou l'éthanol, en présence d'une quantité catalytique de base

organique telle que la pipéridine, à une température comprise entre 20° et la température de reflux du solvant utilisé.

Les indolin-2-ones de formule générale (II) et les aldéhydes aromatiques de formule (III), dans lesquels respectivement R5 et Ar ont les significations précitées, sont soit commerciaux soit préparés selon les conditions décrites dans la littérature.

Des exemples de préparation sont décrits ci-après.

La demanderesse a découvert que les composés de formule (I) conformes à l'invention possèdent des propriétés inhibitrices de protéines kinases (CDK). Ces protéines jouent un rôle clé dans l'initiation, le développement et l'achèvement des événements du cycle cellulaire. Ainsi, les molécules inhibitrices de CDK sont susceptibles de limiter les proliférations cellulaires inopportunes telles que celles observées dans les cancers.

La protéine kinase CDK1 est particulièrement sensible aux effets inhibiteurs des composés de la présente invention.

Les produits de la présente invention possèdent en plus de leurs propriétés inhibitrices spécifiques de la protéine kinase CDK-1, des effets cellulaires tels que des propriétés antiprolifératives par blocage de la division cellulaire en cours de cycle et apoptotiques par induction de l'apoptose cellulaire.

Les composés conformes à l'invention sont notamment utiles dans le cadre de thérapie de tumeurs primaires et de localisations secondaires des cancers.

L'invention a donc pour objet leur utilisation comme médicaments pouvant être utilisés seuls ou en combinaison avec des traitements tels que la chimiothérapie, la radiothérapie ou les traitements anti-angiogéniques mettant éventuellement en œuvre d'autres substances actives. L'invention s'étend aux compositions pharmaceutiques contenant à titre de principe actif l'un au moins des composés de la formule (I) telle que définie ci-dessus dans un milieu pharmaceutiquement acceptable.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être administrées par voie buccale, par voie parentérale ou par voie locale en application topique sur la peau et les muqueuses ou par injection par voie intraveineuse ou intramusculaire. Ces compositions peuvent être solides ou liquides et se présenter sous toutes les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine comme, par exemple, les comprimés simples ou dragéifiés, les pilules, les tablettes, les gélules, les gouttes, les granulés, les préparations injectables, les pommades, les crèmes ou les gels. Elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le principe actif peut y être incorporé à des



excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants, ou émulsifiants, les conservateurs.

La posologie usuelle, variable selon le produit utilisé et le sujet traité peut être, par exemple, de 0,05 à 5 grammes par jour chez l'adulte.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter :

**Exemple 1: 3-(imidazol-4-yl)-5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one**

A une solution de 0,61 g (3 mmoles) de 5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one dans 75 mL d'éthanol contenant 0,02 mL de pipéridine, on ajoute 0,28 g (3 mmoles) d'imidazole-4-carboxaldéhyde. Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant 4 heures. Après refroidissement, le précipité formé est essoré, lavé par 2 fois 5 mL d'éthanol glacé et séché sous pression réduite. On obtient ainsi 0,62 g (75 %) de 3-(imidazol-4-yl)-5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one, sous forme d'un solide jaune citron dont la caractéristique est la suivante : point de fusion = 310°C.

**Exemple 2: 3-(pyrrol-2-yl)-5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one**

En opérant comme à l'exemple 1, mais à partir de 2,1 g (10 mmoles) de 5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one dans 150 mL d'éthanol et de 0,99 g (10 mmoles) de pyrrole-2-carboxaldéhyde, on obtient 2,66 g (92,5%) de 3-(pyrrol-2-yl)-5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one, sous forme d'un solide orange dont la caractéristique est la suivante : point de fusion = 225°C.

**Exemple 3 : 3-(imidazol-4-yl)-5-N-méthylcarboxamido-indolin-2-one**

En opérant comme à l'exemple 1, mais à partir de 0,2 g (1,05 mmoles) de 5-méthylcarboxamido-indolin-2-one dans 25 mL d'éthanol et de 0,1 g (1,04 mmoles) de imidazole-5-carboxaldéhyde, on obtient 0,21 g (84%) de 3-(imidazol-4-yl)-5-N-

méthylcarboxamido-indolin-2-one, sous forme d'un solide orange dont la caractéristique est la suivante : point de fusion > 260°C.

**Exemple 4 : 3-(imidazol-4-yl)-5-acétylamino-indolin-2-one**

5

En opérant comme à l'exemple 1, mais à partir de 0,4 g (2,1 mmoles) de 5-acétylamino-indolin-2-one dans 50 mL d'éthanol et de 0,2 g (2 mmoles) de imidazole-4-carboxaldéhyde, on obtient 0,31 g (58%) de 3-(imidazol-4-yl)-5-acétylamino-indolin-2-one, sous forme d'un solide orange dont la caractéristique est la suivante : point de fusion > 260°C.

10

**Exemple 5 : synthèse en parallèle de 3-(aryl)méthylène-indolin-2-one de formule générale (I)**

15

Dans un réacteur magnétique chauffant avec condenseur Zymark, de type STEM RS2050 contenant 25 puits en parallèle munis chacun d'un tube en verre de 50 mL, on introduit 0,5 mmole d'indolyl-2-one de formule générale (II), 0,5 mmole d'un aldéhyde aromatique de formule générale (III), 5 mL d'éthanol et 1 goutte de pipéridine. Le milieu réactionnel est porté au reflux pendant une nuit. Après refroidissement, et dilution avec 5 mL d'eau, le précipité formé est essoré et séché sous pression réduite. On obtient ainsi les 3-(aryl)méthylène-indolin-2-ones de formule générale (I), représentées par exemple et à titre non limitatif par les composés 5-1 à 5-14.

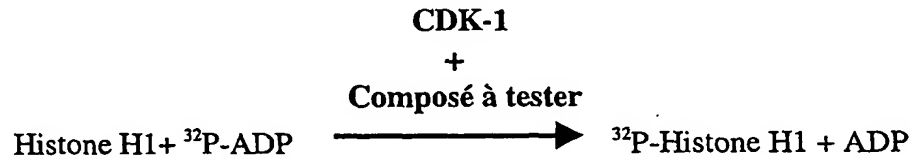
20

25

**Exemple 6: Dosage de l'inhibition de l'activité p34<sup>cdc2</sup>/cycline B par les composés selon l'invention :**

L'inhibition de l'activité p34cdc2/cycline B (CDK1/cycline B) est déterminée par un protocole qui permet de mesurer l'activité de transfert par l'enzyme, d'un groupement <sup>32</sup>P, à partir d'ATP[γ-<sup>32</sup>P] sur un substrat, l'histone H1.

30



5

Les préparations d'enzymes utilisées correspondent soit à l'enzyme p34<sup>cdc2</sup>/cycline B d'étoile de mer (fournie par L. Meijer, CNRS, Station Biologique, Roscoff, France), soit à l'enzyme p34<sup>cdc2</sup>/cycline B humaine recombinante (fournie par New England Biolabs, Inc., Beverly, MA01915, USA). La protéine Histone H1 (type

10

III-S) est obtenue auprès de Sigma.

Le tampon C contient 60 mM de  $\beta$ -glycérophosphate, 30 mM de nitrophenylphosphate, 25 mM de MOPS pH 7.0, 5 mM d'EGTA, 15 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de dithiothreitol et 0.1 mM d'orthovanadate. La solution d'ATP est préparée en mélangeant 20  $\mu\text{L}$  d'ATP [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] à (3000 Ci/mme) et 90  $\mu\text{L}$  d'ATP non radioactif à 1

15

mM dans 890  $\mu\text{L}$  de tampon C.

Le milieu réactionnel est préparé selon la composition suivante :

10  $\mu\text{L}$  de préparation enzymatique sont ajoutés à 5  $\mu\text{L}$  d'Histone H1 (5mg/ml dans du tampon C) et à 7  $\mu\text{L}$  de tampon C et mélangés. 17,5  $\mu\text{L}$  du mélange sont répartis dans les tubes juste avant l'essai. 3  $\mu\text{L}$  d'agent inhibiteur à tester sont ajoutés

20

dans chaque tube.

La réaction est démarrée par l'addition de 5  $\mu\text{L}$  de la solution d'ATP suivie d'une incubation de 15 minutes à 30°C. La réaction est arrêtée par l'addition de 0.5 volumes de tampon Laemli 3X. Après chauffage de l'échantillon pendant 5 min à 90°C, les échantillons sont ensuite analysés par électrophorèse en gel de protéine à 10

25

% d'acrylamide pendant 1 heure sous une tension de 200 volts à l'aide d'un système d'électrophorèse Novex. Les gels d'acrylamide sont ensuite séchés sur une feuille de papier whatmann 3MM à 80°C pendant 1 heure.

L'analyse et la quantification de la phosphorylation de l'Histone H1 sont effectués à l'aide d'un appareil Instant-Imager (Packard). Pour chaque concentration de composé testée, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la réaction et calculés à partir du contrôle enzymatique non traité.

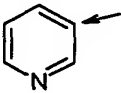
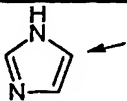
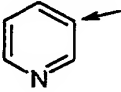
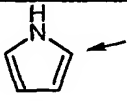
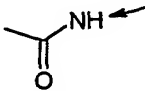
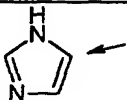
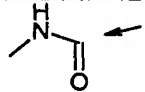
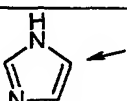
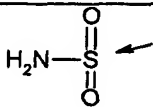
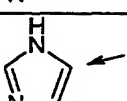
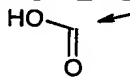
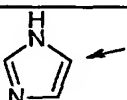
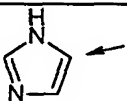
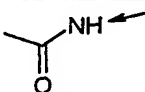
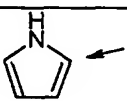
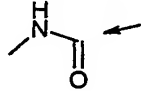
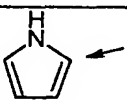
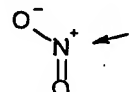
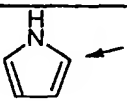
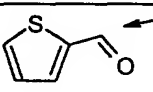
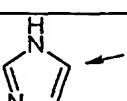
30

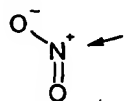
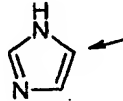
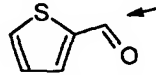
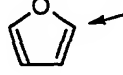
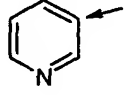
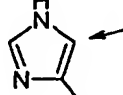
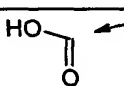
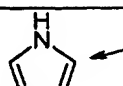
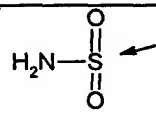
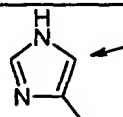
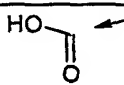
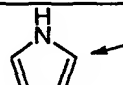
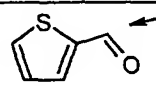
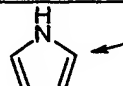
La concentration de composé induisant une inhibition de 50 % de la réaction de phosphorylation de p34<sup>cdc2</sup>/cycline B (IC<sub>50</sub>) est déterminée à l'aide d'une

représentation graphique semi-logarithmique des valeurs d'inhibition obtenues en fonction de chacune des concentrations de composé testée.

Inhibition de CDK1 par les composés de l'invention selon la formule (I)

5

N°	R5	Ar	CDK1 % inhibition à 10 $\mu$ M	CDK1 IC50 en nM
1			99	0,3
2			87	2
3			100	2.5
4			100	0,7
5-1			86	
5-2			85	
5-3	Br		100	16
5-4			80	
5-5			99	
5-6			91	21
5-7			100	10

5-8			81	10
5-9			75	
5-10			100	16
5-11			100	6
5-12			100	3,5
5-13			79	
5-14			62	

On considère qu'un composé est actif en tant qu'agent anti-P34<sup>cdc2</sup>/cycline B lorsque la CI50 est inférieure à 5  $\mu$ M (5000 nM d'après les unités de mesure utilisées dans le tableau). Plusieurs composés peuvent donc être considérés comme inhibiteurs du complexe CDK1/cycline B et en particulier le n°1.

#### **Exemple 7: Détermination de l'inhibition de clonogénicité :**

Les lignées de cellules humaines KB, HCT-116, HT-29, HCT-8, Lovo, PC-3, PC-14, HLF et HLE ainsi que la lignée de tumeur de rat C6 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville USA). La lignée de tumeur humaine Calc18 est un don du Professeur G. Riou (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France). Les cellules HCT-8, Lovo, PC-3, PC-14, HLF et HLE sont cultivées en couche en flacons de culture dans du milieu RPMI 1640, L-Glutamine à 2 mM, Pénicilline 200

U/ml streptomycine 200  $\mu\text{g/mL}$  et additionné de 10% de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur. Les cellules HCT-116, HT-29, KB, C6 et Calc18 sont cultivées en couche en flacon de culture dans du milieu de Dulbeco's contenant L-Glutamine à 2 mM, Pénicilline 200 U/mL streptomycine 200  $\mu\text{g/mL}$  et additionné de 10% de sérum foetal de veau inactivé par la chaleur.

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont trypsinées, lavées dans du PBS 1X et sont diluées à une concentration finale de 5000 cellules/mL dans du milieu complet. Les produits à tester (dans un volume de 50  $\mu\text{L}$ ) sont ajoutés à 2,5mL de suspension. Ensuite, 0.4 mL d'Agar Noble Difco à 2.4 % maintenu à une température de 45°C sont ajoutés aux cellules. Le mélange est ensuite immédiatement versé dans des boîtes de Pétri et laissé à +4°C pendant 5 minutes pour solidifier la gélose. Le nombre de clones cellulaires (>60 cellules) est mesuré après 12 jours d'incubation à 37°C sous atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Le composé n°1 est testé à des concentrations de 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{M}$  en duplicats. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la clonogénicité par rapport aux contrôles. La CI50 est déterminée graphiquement à partir des résultats moyens déterminés pour chaque concentration de composé.

Inhibition de la clonogénicité en agar par le composé n°1  
sur des lignées cellulaires tumorales

Lignée cellulaire	Tissu d'origine	CI50 ( $\mu\text{M}$ )
HCT-116	colon	0.28
HT-29	colon	1.42
HCT-8	colon	1.04
Lovo	colon	0.9
Calc18	sein	1.06
PC-3	prostate	0.19

PC-14	poumon	1.1
HLF	foie	1.1
HLE	foie	1.2
C6	glioblastome	10.8

On considère qu'un composé est actif comme agent cytotoxique si la CI50 est inférieure à 10  $\mu\text{M}$  ce qui est le cas pour toutes les lignées cellulaires testées avec le composé n°1 (à l'exception du glioblastome de rat C6).

5

**Exemple 8 : Mesure de l'inhibition de prolifération par les composés n°1 ou n°2.**

Les cellules HCT-116 sont cultivées en couche en flacon de culture dans du milieu de Dulbecco's contenant L-Glutamine à 2 mM, Pénicilline 200 U/mL streptomycine 200  $\mu\text{g/mL}$  et additionné de 10% de sérum fœtal de veau inactivé par la chaleur.

Les cellules HCT-116 en phase exponentielle de croissance sont trypsinées, lavées dans du PBS 1X et sont ensemencées en microplaques 96 puits (Costar) à raison de  $4 \times 10^4$  cellules/mL et de  $1,5 \times 10^4$  cellules/mL (0.2 mL/puit) puis incubées pendant 96 heures en présence de concentrations variables de produit à étudier (10, 1, 0.1 et 0.01  $\mu\text{g/mL}$ , chaque point en quadruplicat). Seize heures avant la fin de l'incubation, 0.02 % final de rouge neutre est ajouté dans chaque puits. A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées par du PBS 1X et lysées par 1 % de lauryl sulfate de sodium. L'incorporation cellulaire du colorant, qui reflète la croissance cellulaire, est évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm pour chaque échantillon à l'aide d'un appareil de lecture Dynatech MR5000.

Pour chaque concentration de composé testée, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de croissance cellulaire et calculés à partir du contrôle non traité et du milieu de culture sans cellules (blanc) selon la formule suivante :

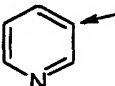
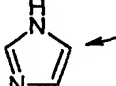
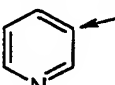
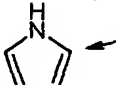
25

(Valeur Composé - valeur blanc / Valeur contrôle cellules -valeur blanc)x 100.

La concentration de composé induisant une inhibition de 50 % de la croissance (IC50) est déterminée à l'aide d'une représentation graphique semi-logarithmique des valeurs d'inhibition obtenues en fonction de chacune des concentrations de composé testées.

5

Inhibition de la prolifération des cellules HCT-116  
par les composés 1 ou 2

N°	R5	Ar	HCT-116 CI50 μM
1			0.28
2			8.0

10

On considère qu'un composé est actif comme agent cytotoxique si dans l'une ou l'autre des méthodes, la CI50 est inférieure à 10 μM ce qui est le cas pour les deux composés testés dans cette expérience.

15

**Exemple 9 : Détermination de l'activité pro-apoptotique et de blocage mitotique sous l'action du composé n°1 :**

Après exposition pendant 48 heures de cellules HCT-8 au composé n°1, les cellules en culture sont trypsinées, lavées au PBS 1X et déposées entre lame et lamelle en présence de Hoechst 33342 à une concentration de 1 μg/mL. Le pourcentage de cellules mitotiques et de cellules possédant des corps nucléaires apoptotiques est déterminé par examen et comptage d'un échantillon d'au moins 300 cellules réparties en plusieurs endroits de la lame à l'aide d'un microscope à fluorescence.

25

Induction d'apoptose et blocage mitotique induits par le composé n°1  
sur la lignée HCT-8



Concentration testée du composé n°1	Cellules apoptotiques (%)	Facteur /témoin	Cellules mitotiques (%)	Facteur /témoin
0 µg/mL (Contrôle)	2.4	1	6,9	1
0.1 µg/mL	8.5	3,5	2,8	0,4
1 µg/mL	16	6,6	0,7	0,1
10 µg/mL	42.5	17,7	0,4	0,06

L'exemple ci-dessus montre une corrélation nette entre la dose de composé n°1 testé et

- 5
- la diminution de cellules au stade de la mitose
  - l'augmentation de cellules en apoptose.

10 **Exemple 10 : Influence de l'action du composé n°1 sur les étapes du cycle cellulaire**

L'analyse par cytométrie de flux permet de mettre en évidence un blocage dans une phase particulière du cycle cellulaire après traitement par un composé.

- 15 Les cellules HCT-116 sontensemencées en boîtes 6 puits Nunc. Le composé n°1 à une concentration de 1 µg/ml est mis en contact avec les cellules pendant 4 heures, 1 jour, 2 jours et 3 jours avant l'analyse.

- 20 L'analyse est effectuée à l'aide d'un test au BrDU : (Dolbeare F. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, p. 5573- 5577). Les cellules sont traitées par le BrDU à 30 µM pendant 30 minutes, puis trypsinées. Après fixation des cellules dans du paraformaldéhyde à 1 % pendant 16 heures, celles-ci sont digérées dans de la pepsine chlorhydrique, puis rincées dans du PBS 1X. Un marquage immunologique est réalisé avec un anticorps primaire anti-BrDU (Becton Dickinson) et un anticorps secondaire

GAM-FITC (Coulter). L'ADN est ensuite marqué avec de l'iodure de propidium dans du PBS contenant 1 mg/ml de RNase bouillie. Cette méthode permet de comptabiliser les cellules en phase G1, S et G2M.

5

Etude par cytométrie de flux des modifications du cycle cellulaire induites par le composé n° 1 sur la lignée HCT-116

HCT-116	Temps de contact	Cellules en phase G1 (%)	Cellules en phase S (%)	Cellules en phase G2-M (%)
Cellules non traitées	4 h	70.8	16.7	10.8
	24 h	65.6	19.3	13.8
	48 h	65.0	19.9	13.5
	72 h	65.8	20.1	12.8
Cellules traitées (1 µg/mL du composé n°1)	4 h	62.2	20.1	16.4
	24 h	26.8	39.5	31.4
	48 h	7.9	30.9	58.9
	72 h	7.8	5.1	82.4

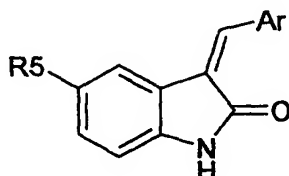
10

Dans les cellules non traitées, la proportion de cellules en transition G2/M est de l'ordre de 10 à 14 % alors que dans les cellules préalablement mises en contact avec le composé n°1, ce taux augmente jusqu'à atteindre plus de 80 % au bout de 72 heures. Ainsi, dans cette expérience, presque toutes les cellules sont stoppées en phase G2/M par l'action du composé n°1.

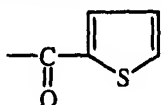
15

## REVENDEICATIONS

### 1. Composé de formule (I) :



- 5 dans laquelle R5 est choisi parmi les groupements 3-pyridinyle, 5-pyrimidinyle, -CONH-alkyle en C1-C4, -NHCO-alkyle en C1-C4, halogène, -CO<sub>2</sub>R où R peut être hydrogène ou alkyle en C1-C4, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>,



dans laquelle Ar est choisi parmi les groupements 5-imidazolyle, 2-pyrrolyle éventuellement substitués par un radical alkyle en C1-C4, 2-furyle, ou 2-thiazolyle, sous la forme E, Z ou un mélange des deux formes d'isomères.

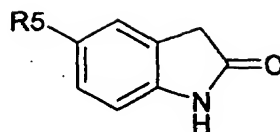
- 10 2. Composé selon la revendication 1 caractérisé par le fait que R5 est un groupement 3-pyridinyle ou -CONH-méthyle ou -NHCO-méthyle.

3. Composé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé par le fait que Ar est un groupement 5-imidazolyle ou un 5-(4-méthyl-imidazolyle) ou un 2-pyrrolyle.

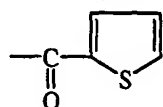
- 15 4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé par le fait qu'il est choisi parmi :

3-(imidazol-4-yl)-5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one,  
 3-(pyrrol-2-yl)-5-(pyridin-3-yl)-indolin-2-one,  
 3-(imidazol-4-yl)-5-N-méthylcarboxamido-indolin-2-one,  
 3-(imidazol-4-yl)-5-acétylamino-indolin-2-one.

- 20 5. Procédé de préparation des composés de formule (I) caractérisé par le fait que l'on soumet le composé de formule (II) :

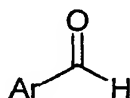


dans laquelle R5 est un groupement choisi parmi 3-pyridinyle, 5-pyrimidinyle, -CONH-alkyle en C1-C4, -NHCO-alkyle en C1-C4, halogène, -CO<sub>2</sub>R où R peut être hydrogène ou alkyle en C1-C4, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>,



5

à une réaction avec un composé de formule (III) :



10 où Ar est choisi parmi les groupements 5-imidazolyle, 2-pyrrolyle éventuellement substitués par un radical alkyle en C1-C4, 2-furyle, ou 2-thiazolyle.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que la réaction s'effectue en présence de pipéridine et d'éthanol au reflux.

7. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour son application comme médicament.

15 8. Composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle comprend dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

20 9. Médicament caractérisé par le fait qu'il contient au moins un composé composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le traitement des maladies associées à une dérégulation d'un complexe enzymatique responsable de la transition G2/M dans le cycle cellulaire.

10. Médicament selon la revendication 9 pour son application thérapeutique dans le traitement des tumeurs primaires et secondaires des cancers.

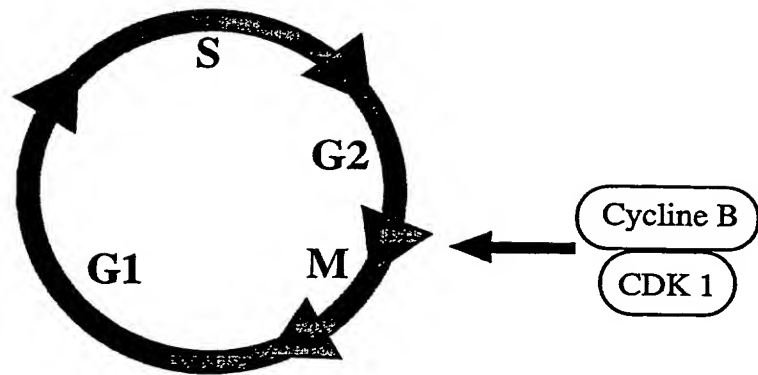
11. Médicament selon la revendication 9 pour son application dans le traitement du cancer par action inhibitrice sur les kinases dépendantes des cyclines (CDK).

5 12. Médicament selon la revendication 9 pour son application dans le traitement du cancer par action inhibitrice sur le CDK-1.

13. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

10 14. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer en combinaison avec un traitement par chimiothérapie, radiothérapie ou un traitement anti-angiogénique.

**Figure 1**



DÉPARTEMENT DES BREVETS

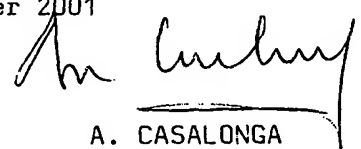
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / . 3.  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		B 00/4118 FR/GD/LM	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0102624	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
Oxindoles inhibiteurs de CDK-1 et leur application en thérapeutique.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
Société Anonyme dite : AVENTIS PHARMA S.A.			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
<b>Nom</b>		RIOU	
<b>Prénoms</b>		Jean-François	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	8 avenue du Général Leclerc	
	<b>Code postal et ville</b>	75014	PARIS
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		MARATRAT	
<b>Prénoms</b>		Michel	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	10 rue d'Orléans	
	<b>Code postal et ville</b>	94290	VILLENEUVE LE ROI
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>Nom</b>		GRONDARD	
<b>Prénoms</b>		Luc	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	9 Square Babord	
	<b>Code postal et ville</b>	91080	COURCOURONNES
<b>Société d'appartenance</b> (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 27 février 2001  A. CASALONGA (bm 92-1044i) Conseil en Propriété Industrielle	



...



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .2. / .3.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B 00/4118 FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0102624	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Oxindoles inhibiteurs de CDK-1 et leur application en thérapeutique.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
Société Anonyme dite : AVENTIS PHARMA S.A.			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		THOMPSON	
Prénoms		Fabienne	
Adresse	Rue	25 rue Cotte	
	Code postal et ville	75012	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		PETITGENET	
Prénoms		Odile	
Adresse	Rue	31 rue du Moulin Vert	
	Code postal et ville	75014	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MAILLIET	
Prénoms		Patrick	
Adresse	Rue	87 rue Dalayrac	
	Code postal et ville	94120	FONTENAY SOUS BOIS
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 27 février 2001  A. CASALONGA (bm 92-1044i) Conseil en Propriété Industrielle	



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

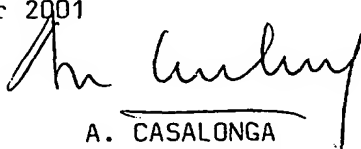
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3 / 3.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 26/539

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		B 00/4118 FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0102624	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)			
Oxindoles inhibiteurs de CDK-1 et leur application en thérapeutique.			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>			
Société Anonyme dite : AVENTIS PHARMA S.A.			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		LAVAYRE	
Prénoms		Jacques	
Adresse	Rue	21 rue des Jachères	
	Code postal et ville	94440	MAROLLES EN BRIE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire )		Paris, le 27 février 2001   A. CASALONGA (bm 92-1044i) Conseil en Propriété Industrielle	

